



Acta Biológica Colombiana

ISSN: 0120-548X

racbiocol_fcbog@unal.edu.co

Universidad Nacional de Colombia Sede

Bogotá

Colombia

ALCÁZAR ARZUZA, Jéssica Paola; BAYONA ARCINIEGAS, Andrea Julieth; DE LOS
REYES, Lina María; TURNER, Liliana Francis

EVALUACIÓN COMPORTAMENTAL DEL TRASPLANTE DE hMSC-GFP+ EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE HEMIPARKINSON EN RATA WISTAR

Acta Biológica Colombiana, vol. 22, núm. 2, mayo-agosto, 2017, pp. 127-136

Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá

Bogotá, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=319051099001>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN/RESEARCH ARTICLE

EVALUACIÓN COMPORTAMENTAL DEL TRASPLANTE DE hMSC-GFP+ EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE HEMIPARKINSON EN RATA WISTAR

Behavioral Evaluation of hMSC-GFP+ Transplantation in an Hemiparkinson Experimental Model in Wistar Rat

Jéssica Paola ALCÁZAR ARZUZA¹, Andrea Julieth BAYONA ARCINIEGAS¹, Lina María DE LOS REYES¹, Liliana Francis TURNER¹.

¹ Grupo Modelos Experimentales para las Ciencias Zootécnicas (GME-CZH), Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Bloque 12. Ibagué, Colombia.

For correspondence. jpalcazara@ut.edu.co

Received: 22nd August 2016, Returned for revision: 20th February 2017, Accepted: 23rd March 2017.

Associate Editor: Argel Aguilar-Valles.

Citation/Citar este artículo como: Alcázar Arzuza JP, Bayona Arciniegas AJ, de Los Reyes LM, Turner LF. Evaluación comportamental del trasplante de hMSC-GFP+ en un modelo experimental de hemiparkinson en rata Wistar. Acta biol. Colomb. 2017;22(2):127-136. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v22n2.59703>

RESUMEN

Se evaluó el efecto del trasplante de hMSC-GFP+ en un modelo experimental de Enfermedad de Parkinson (EP) en 27 ratas Wistar con tres grupos experimentales: control: animales sin cirugía, (CON n=7), lesionado: animales lesionados intracerebralmente con 6-OHDA a nivel de SNpc (LES n=10) y transplantado: animales LES con trasplante de hMSC-GFP+ intraestriatalmente (LES-T n=10). Con el fin de evaluar la influencia del trasplante en el comportamiento motor, un mes después de la lesión, se desarrolló una batería comportamental compuesta por Test Neurológico (compuesto también por Pole Test y Test de Barra transversal, además, de inmunofluorescencia para células de SNpc con TH). Utilizando el test de Anova, se demostró una disminución en el número de giros en animales transplantados ($p=0,005$), así como en el test neurológico ($p=0,0004$) y en el Test de barra transversal, que colocan a este grupo en una posición intermedia con respecto a LES y CON. Existe una posible recuperación de la vía nigroestriatal mediada por el trasplante de hMSC-GFP+.

Palabras clave: terapia celular, células madre mesenquimales, deterioro motor, enfermedad de Parkinson, rata Wistar.

ABSTRACT

The effect of hMSCs-GFP+ transplantation was evaluated in an experimental model of Parkinson's disease (PD) in 27 Wistar rats, or in three experimental groups: control (CON n=7), injured (LES n=10) and transplanted (LES+T n=10). In order to evaluate the influence of the transplantation on the motor behavior, one month after the injury, rotation behavior induced by apomorphine, neurological test, transversal bar and SNpc cells positive to TH were developed. Using the Anova test, there was a decrease in the number of turns in transplanted animals ($p=0,005$) as well as in the neurological test ($p=0,0004$) and in the transverse bar that lead to this group in an intermediate position regarding LES and CON groups. There is a possible recovery of the transplantation-mediated nigrostriatal pathway of hMSC-GFP +.

Keywords: cell Therapy, mesenchymal stem cells, motor impairment, Parkinson disease, Wistar rat.



INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo que afecta alrededor de seis millones de personas de edad avanzada en el mundo, por lo que se espera que la incidencia aumente a medida que las causas de mortalidad se reducen (Maranis *et al.*, 2011; Crabtree y Zhang, 2012). La EP se caracteriza por manifestaciones motoras como temblor, rigidez, bradicinesia, trastornos de la marcha y del equilibrio (Poletti *et al.*, 2011) y múltiples síntomas no motores como son trastornos cognitivos, del estado de ánimo, gastrointestinales, autonómicos, del sueño, etc. (Wang *et al.*, 2002; Da Cunha *et al.*, 2006; Ardayfio *et al.*, 2008, Aarsland *et al.*, 2010; Aarsland, 2015). En la actualidad, los tratamientos en uso farmacológico con L-DOPA así como la estimulación cerebral profunda mejoran los síntomas parkinsonianos pero no reparan la vía dopaminérgica o previenen su degeneración (Tronci *et al.*, 2012). De esta manera, las nuevas terapias con enfoques nuevos como por ejemplo el trasplante celular, promete restaurar la función dopaminérgica (Bouchez *et al.*, 2008). La terapia celular implica el empleo de células y sus productos para el diagnóstico, tratamiento o paliación de una enfermedad tomando en cuenta que las células se consideran un insumo o su equivalente a un fármaco (Benítez, 2011). En este sentido, el uso clínico de las Células Madre Mesenquimales para la regeneración de tejido, modulación inmunológica, o trasplante ha alcanzado dimensiones de consideración importante y discusión para científicos y comunidades clínicas (Martín *et al.*, 2016). A pesar de la incidencia y prevalencia en la población de la EP, aún es imprecisa la forma en como se desarrolla la EP, para tal efecto, los modelos animales de EP, se han originado a partir de esta idea y se han empleado en una variedad de manipulaciones genéticas y/o de insultos tóxicos exógenos o endógenos para recapitular la sintomatología y/o neuropatología de EP (Da Cunha *et al.*, 2006; Meredith y Kang, 2006). Uno de los modelos más utilizados en los estudios (tanto básicos como aplicados de la EP) es el de lesión de la sustancia negra (SN) utilizando, la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) específica para neuronas dopaminérgicas que al ser inyectada estereotáxicamente en la Sustancia nigra *pars compacta* (SNpc) es capaz de destruir selectivamente las neuronas dopaminérgicas (Masaaki *et al.*, 2010; Blum *et al.*, 2001; Bové *et al.*, 2005). La lesión unilateral de la SNpc provoca un déficit crónico y laterización de la conducta de los animales, los que presentarán actividad rotatoria espontánea, que se ve incrementada con el uso de agonista dopaminérgicos y la indiferencia sensoriomotora a los estímulos aplicados en el hemicuerpo contralateral al hemisferio lesionado (Brederlau *et al.*, 2006; Deierborg *et al.*, 2008; Boronat-García *et al.*, 2016). En cuanto a la terapia celular, Luo *et al.* (2009), concluyen que las CMM trasplantadas intraestriatalmente en un modelo murino de MPTP mejora el comportamiento, no por reemplazo

celular sino por reparar mecanismos o por su acción anti-inflamatoria. Por otro lado, Glavaski-Joksimovic y Bohn (2013), mencionan que las CM derivadas de médula ósea trasplantadas en el estriado ejercen neuroprotección en contra de la neurodegeneración y mejora la función motora en ratas lesionadas con 6-OHDA. En un ensayo realizado en humanos, se concluyó que éstas células exhiben potencial para diferenciarse a varios precursores dopaminérgicos y en trasplante en modelos animales, induce mejora comportamental en ratas hemiparkinsonizadas (Venkataramana *et al.*, 2010). Varios Test se han usado para calificar modelos en ratones como lo son: actividad locomotora, rotarod, longitud de zancada, test de la rejilla y Pole test. (Taylor *et al.*, 2010), o la prueba de habilidades motoras de las extremidades anteriores (Pavon-Fuentes *et al.*, 2004). Sin embargo, estos test, evalúan el estado motriz del animal representado en el desempeño de la prueba basado en el uso de extremidades anteriores o posteriores, sin ver el modelo experimental como un conjunto complejo de señales comportamentales que involucran todas las extremidades y la cola como un todo. Teniendo en cuenta lo mencionado con anterioridad, este trabajo pretende evaluar si el trasplante de Células madre Mesenquimales positivas a GFP (hMSC-GFP+) tiene un efecto sobre el deterioro motor en un modelo de Hemiparkinson en rata Wistar mediante el uso de una batería comportamental compuesta por: test sensoriomotor, pole test y barra trasversal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 27 ratas Wistar macho de 200 y 250 g de peso corporal, que fueron mantenidas en cajas tipo T-4 en la proporción de cinco animales por caja, con un ambiente convencional controlado (humedad relativa de 60 +/- 5 %, temperatura de 21° +/- 1° C, fotoperiodo de 12:12 luz/oscuridad), en el bioterio de Experimentación de la Universidad del Tolima (BEA-UT), en la ciudad de Ibagué. Recibieron una alimentación controlada 15 g/día/animal (Concentrado Labdiet para Ratas y ratones) y agua *ad-libitum* acorde a los principios Rectores Internacionales aplicables a las investigaciones biomédicas con animales del Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias (Comité consultivo de investigaciones médicas de OMS, 1985), a la ley 84 de 1989 sobre protección animal en Colombia y la Resolución 8430 de 1993. La investigación se revisó y aprobó por el Comité de Bioética de la Universidad del Tolima.

Diseño experimental

Para comprobar el estado sensorial de los animales se realizó un test neurológico a cada individuo, solo se tuvieron en cuenta, aquellos que ejecutaran la prueba con una eficiencia del 100 %. Se distribuyeron aleatoriamente 27 ratas Wistar así: grupo LES: animales lesionados a nivel de SNpc, a través de una inyección esterotáctica intracerebral con 6-OHDA (n=10), grupo LES+T: animales lesionados a nivel de SNpc

a través de una inyección esterotáxica intracerebral de 6-OHDA y quince días después de comprobada la eficacia de la lesión a través de prueba de rotación inducida por agonistas dopaminérgicos, recibieron el trasplante de células madre mesenquimales humanas ($n=10$) y grupo CON: animales intactos ($n=7$).

Inducción al Modelo de Hemiparkinsonismo con 6-OHDA. Las ratas fueron anestesiadas utilizando un coctel de Ketamina (Gabriela®, Colombia) (80 mg/kg de peso) y Xilacina (Virbac®, Colombia) (5mg/kg de peso) y dispuestas en el aparato esterotáxico (Stoeling® Modelo: 51500; México D.F.) en posición cúbito prono. Los animales recibieron una inyección intracerebral unilateral (hemisferio derecho) de 6-OHDA (Sigma Aldrich, U.S.) (neurotoxina dopaminérgica) a una concentración de 8 μ g/3 μ l de solución salina(0,2 mg/ml) de ácido ascórbico (Sigma Aldrich, U.S.), mediante una jeringuilla Hamilton (Hamilton®, U.S.) de 10 μ l, fueron inyectados 3 μ l de la neurotoxina a una velocidad de flujo de 1 μ l/min, en las coordenadas AP (antero-posterior)= 4,4 mm posterior de Bregma, ML (medio-lateral) = 1,2 mm a la derecha de la línea media y DV (dorso-ventral) = 7,8 mm por debajo de la duramadre. Después de la inyección la aguja se mantuvo *in situ* cinco minutos antes de que fuera extraída amablemente para evitar el reflujo.

Aplicación del trasplante. Línea celular MSCh-GFP+. Las células MSCh (células madre mesenquimales humanas) utilizadas para la terapia de reemplazo celular, fueron donadas por el centro Colombiano de Fertilidad y Esterilidad (CECOLFES), obtenidas de un donante sano, previa aprobación por el Comité Institucional de Ética, fueron transfundidas con la proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein-GFP- por sus siglas en inglés) utilizando la tecnología lentivirus. Pre y post traducción lentivirus, se estudió y caracterizó la morfología de MSC inmunofenotipo, cariotipo, así como a la diferenciación a los linajes osteogénico, adipogénico, y neurogénico). Las células se mantuvieron en DMEM bajo en glucosa (Sigma Aldrich, U.S.), 10 % suero fetal bovino (SFB) (Sigma Aldrich, U.S) y 1 % de penicilina /estreptomicina (Ambos reactivos, Thermo Fisher Scientific). Para la preparación de la suspensión celular, las células en cultivo fueron sometidas a una digestión enzimática con tripsina 0,25 %/1mM EDTA. Esta suspensión, se resuspendió en 500 μ L de medio DMEM sin SFB y se incubaron hasta el trasplante, se realizó el recuento celular en una cámara de Neubauer mediante el test de azul tripán (Thermo Fisher Scientific, U.S.).

Trasplante intracerebral de células madre mesenquimales humanas. Los animales fueron anestesiados con una solución conjunta de Ketamina (Gabriela®, Colombia) (80 mg/kg de peso) y Xilacina (Virbac®, Colombia) (5mg/kg de peso) y colocados en el aparato esterotáxico (Stoeling® Modelo: 51500; México D.F.). Recibieron 2 μ l de la suspensión celular de MSCh-GFP+, con una concentración de 100.000 en dos puntos esterotáxicos (50.000 cel/uL/punto esterotáxico) en la región estriatal: (1): AP= 1 mm posterior a Bregma,

ML= 3,0 mm a la derecha de la línea media y DV=4,5 mm por debajo de la duramadre; y (2): AP= 1 mm posterior a Bregma; ML= 3,0 mm a la derecha de la línea media y DV= 5,0 mm por debajo de la duramadre, respectivamente. El tiempo de cirugía no sobrepasó los 45 minutos posteriores a la preparación de la suspensión celular.

Calidad del Trasplante. Se realizó una expansión de la colonia MSCh-GFP+ donadas, la cual permitió trasplantar en cada animal 2 μ l en suspensión celular con una concentración de 100×10^6 (50.000 cel/uL) en la región estriatal, el proceso del trasplante siempre mantuvo el mismo número de células, puesto que la suspensión celular se preparaba simultáneamente al momento de realizar el trasplante en cada animal.

Pruebas comportamentales

Actividad rotatoria. Para evaluar la lesión se llevó a cabo la prueba de actividad rotatoria inducida por inyección intraperitoneal de apomorfina (Sigma Aldrich, U.S.), (0,5 mg/kg de peso) (Mendez y Finn, 1975; Issy *et al.*, 2015), 15 días después de producida la lesión y un mes después del trasplante. La conducta rotatoria se evaluó registrando el número de vueltas completas (360°) contralateral al hemisferio lesionado durante 90 minutos luego de la inyección de apomorfina.

Test neurológico. Consiste en una serie de pruebas que permiten determinar el estado del sistema nervioso central (Bures y Buresova, 1983), se realizan con el fin de determinar la condición sensoriomotriz de los animales para la ejecución de un experimento. Las pruebas que se realizaron fueron las siguientes: 1. Reflejo de Flexión: se apoya el animal en una superficie plana y cerca de los límites al vacío y se retira una de las extremidades para observar la calidad de la reacción flexión y retracción de la extremidad y de apoyo sobre la superficie. 2. Reacción de apoyo o localización por contacto: se acerca al animal desde un plano horizontal a una base plana o mesa y se observa si estira sus extremidades anteriores para hacer contacto con ellas antes que con otra parte del cuerpo. 3. Reflejo de corrección de posición: Se coloca el animal boca arriba sobre una superficie plana. Se espera que el animal asuma inmediatamente la posición correcta (boca abajo y sobre sus cuatro patas). Esto también debe suceder, cuando es sostenido incorrectamente por región lumbosacral y la parte superior del cuerpo que está libre (cabeza, extremidades superiores). Cuando por el contrario la cabeza del animal es sujetada, las extremidades libres, deberán adoptar la posición correcta. 4. Localización visual. Cuando la rata se acerca al borde de una base o mesa desde un plano vertical (de altura), debe localizar la superficie por señales visuales con las vibrissas. Posteriormente, estirar sus extremidades anteriores para posicionarse en dirección hacia el borde de la superficie. 5. Pole Test: Se ubica el animal sobre el extremo superior de un cilindro de aluminio con 1 m de largo x 60 cm de diámetro, forrado con tela gruesa

durante un minuto. Se evalúa la corrección de postura del animal para descender de la barra y además el uso de las cuatro extremidades y la cola.

Barra trasversal. La prueba de la barra transversal fue realizada en condiciones apropiadas de silencio e iluminación evaluando sus resultados por observación directa. Las ratas fueron colocadas en el punto medio de una barra de 60 cm de longitud en cuyos extremos se alojaron plataformas de escape redondas de 15 cm de diámetro. Los sujetos experimentales se colocaron en una barra de 2,5 cm de diámetro. La barra se situó a una altura de 60 cm del suelo e inmediatamente debajo de la misma fue colocada una caja de plástico con una toalla con el propósito de proteger a los animales de posibles golpes si caían de la barra. Cada ensayo tuvo una duración de 1 min y durante este tiempo se cuantificaron las siguientes variables: tiempo que demora la rata en alcanzar una de las dos plataformas de escape (latencia de escape, LE); fallo para alcanzar una de las plataformas hasta caer de la barra (latencia de caída, LC); número de errores cometidos por la rata durante la ejecución de la prueba (número de errores, NE).

El experimento completo se realizó durante dos días consecutivos, efectuándose tres ensayos cada día. Las variables fueron computadas como el valor medio de los seis valores obtenidos contemplando todos los ensayos.

Estudios morfológicos

El procesamiento histológico de los tejidos cerebrales fue llevado a cabo en el laboratorio de Biotecnología aplicada de la Universidad del Tolima, LABIOAUT. Para el análisis histológico, los animales se sacrificaron con sobredosis de Pentobarbital Sódico (Invet, Colombia) y se perfundieron por el método de gravedad utilizando 250 ml de solución salina 0,9 % y 250 ml de paraformaldehído al 4 % por cada animal; los cerebros fueron extraídos y post fijados en paraformaldehído (Sigma Aldrich, U.S.), al 4 %, y sometidos a un gradiente ascendente de sacarosa (Sigma Aldrich, U.S.) (7 %, 25 % y 30 %) a 4 °C. Los tejidos extraídos se criopreservaron a -20°C hasta la realización de los cortes. Los cerebros fueron cortados en secciones coronales de 50 µm de grosor en un vibrátomo Leica VT 1000S (Leica Microsystems, U.S.), previo al corte, se realizó una marca en el hemisferio izquierdo (hemisferio intacto). Se escogieron cortes al nivel de -4,89 de bregma. El estudio de inmunofluorescencia se llevó a cabo al mes de producido el trasplante de MSCh-GFP+; y se evaluó la inmunoreactividad de Tirosina hidroxilasa (TH). Para el desarrollo de la inmunofluorescencia, las secciones coronales, fueron lavados tres veces con PB 0,1M por cinco minutos) y cloruro de amonio (N_4HCl) 50mM durante diez minutos, esto, para evitar la autofluorescencia del tejido, se lavaron los tejidos con PB 0,1 M tres veces por cinco minutos y se adicionó la solución de bloqueo 1 durante 20 minutos a 37 °C, posteriormente se incubaron los tejidos con el anticuerpo primario TH (Sigma Aldrich, U.S.) (1:300) por 48

horas a 4 °C. Pasado este tiempo se lavaron los tejidos con PB 0,1M 3 veces por cinco min. Como anticuerpo secundario, fue usado el anticuerpo Goat anti-mouse IgG 594 (Thermo Fisher Scientific, U.S.) (1:500) por dos horas a temperatura ambiente, luego los tejidos se lavaron con PB 0,1M cinco veces por cinco minutos y los cortes se organizaron en las placas con previamente tratadas con Poly-L-lisina (Thermo Fisher Scientific, U.S.) (0,01 %) debidamente marcadas. Los cortes se fijaron con Fluoromount® para su posterior observación.

Procesamiento estadístico y análisis de los resultados

Los resultados se analizaron utilizando el software Statistica 10,1. Utilizando Anova no paramétrica (Kruskal wallis) y, debido a la normalidad Newman Keuls como análisis pos hoc. El número de células positivas a TH, Número de vueltas, Latencia de Escape, Latencia de Caída y Número de Errores fueron evaluados.

RESULTADOS

Rotación. Todos los animales lesionados mostraron actividad rotatoria inducida por apomorfina acorde con los criterios de inclusión. Un mes después del trasplante con MSCh, las ratas pertenecientes a este grupo experimental, mostraron una diferencia estadísticamente significativa en la conducta de rotación inducida por apomorfina (Fig. 1). El Wilcoxon matched pair test reveló una diferencia significativa entre el número de vueltas contralateral antes y después del trasplante, $Z=2,803$ ($p < 0,01$), lo que demostró que el trasplante fue capaz de producir una mejoría en la conducta de rotaciones inducida por la apomorfina en comparación con el grupo lesionado.

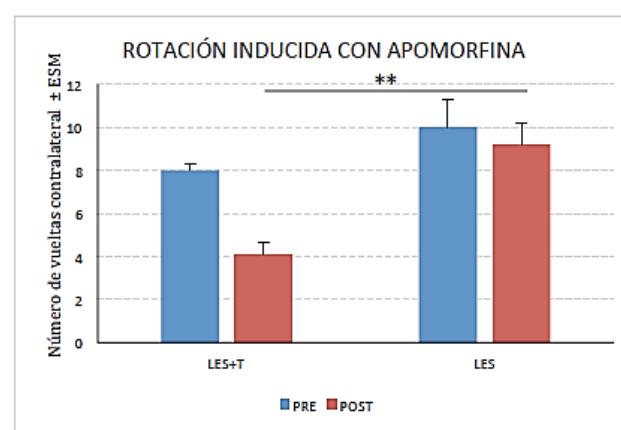


Figura 1. Comparación del promedio de rotaciones contralaterales inducidos por apomorfina entre los grupos LES y LES + T se respresenta: Número de vueltas ± ESM (ordenadas), grupos LES+T y LES (abcisas). PRE: Rotación realizada previo al trasplante. POST: Rotación realizada despues del trasplante. Cada grupo se muestra con la desviación estándar. El (*) representa la diferencia significativa ($p<0,001$) presente entre los dos grupos.

Tabla 1. Relación de A ciertos obtenidos pre y pos trasplante en los grupos evaluados.

Grupos	Control		Lesionado		Trasplantado	
Prueba	A.A	A.D	A.A	A.D	A.A	A.D
Reflejo de caída	100%	100%	100%	100%	100%	100%
R. Flexión-retención derecha	100%	100%	80%	80%	90%	100%
R. Flexión-retención izquierda.	100%	100%	20%	20%	20%	80%
R. Enderezamiento tren anterior	100%	100%	100%	100%	100%	100%
R. Enderezamiento. Tren Post	100%	100%	0%	100%	0%	100%
R. acercamiento plano arriba der.	100%	100%	100%	100%	100%	100%
R. acercamiento plano arriba izq.	100%	100%	40%	40%	30%	100%
R. acercamiento plano horizontal der.	100%	100%	100%	100%	100%	100%
R. acercamiento plano horizontal izq.	100%	100%	90%	90%	80%	100%

Test Neurológico. La respuesta de los grupos al test neurológico permitió valorar la influencia de la lesión en el estado neurológico de los animales pre y post tratamiento, mostrando un soporte valioso que valoró la influencia de la lesión y posteriormente el trasplante; a continuación se muestran las tablas de resultados de las pruebas desarrolladas a cada uno de los grupos.

Pole test. Un mes después del trasplante, los animales demostraron en esta prueba su recuperación en cuanto a la

corrección de postura y estrategias de descenso, al compararlo con los grupos control intacto y animales lesionados. El Anova reveló para la variable, diferencia significativa entre los grupos, ($p<0,001$) que se enfatizó entre los grupos control y lesionado, mientras el grupo trasplantado ocupó una posición intermedia. (Ver Fig. 2).

Barra trasversal. La prueba de Anova para la comparación de grupos demostró una diferencia significativa para la variable latencia de escape (LE), $F_{(2, 25g)} = 7,45$, $p<0,003$. El

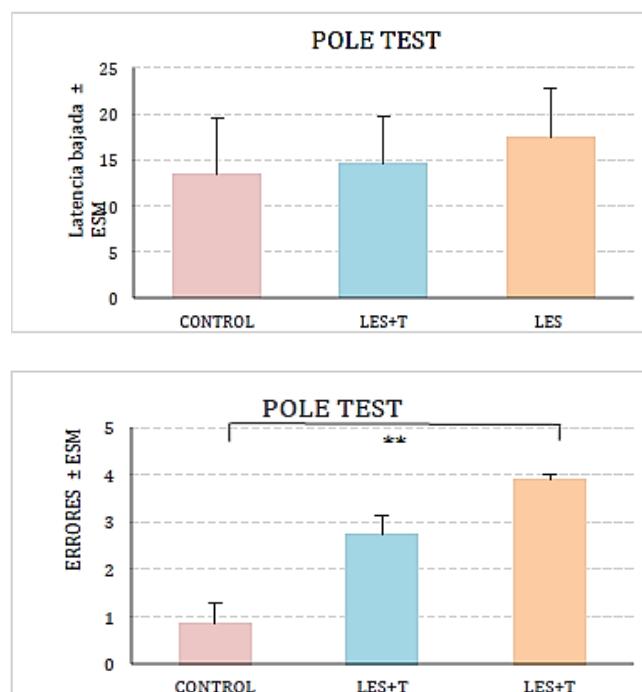


Figura 2. Izquierda. Comparación del promedio del tiempo de bajada entre los grupos control, lesionado y trasplantado, Latencia de bajada (ordenadas), grupos control. LES+T y LES (abscisas). Cada grupo muestra con la desviación estándar. Derecha. Comparación del promedio de los errores entre los grupos control, lesionado y trasplantado, se respresenta: Errores (ordenadas), grupos control. LES+T y LES (abscisas). ** diferencia altamente significativa $p<0,001$.

grupo control intacto tuvo un desempeño superior al grupo LES+T, $p<0,002$ y $p<0,03$ respectivamente. Mientras que la latencia de caída (LC), no reveló diferencia entre grupos, si se observó diferencia entre el número de errores (NE) en la realización de la prueba entre los diferentes grupos, $F_{(2, 25g)} = 2$, $p<0.001$. Los animales controles intactos y trasplantados tuvieron un comportamiento similar, alejado del desarrollado por el grupo de animales lesionados (Figs 3a, 3b y 3c).

Comprobación del modelo de Hemiparkinsonismo. La lesión unilateral en el hemisferio derecho por inyección intracerebral de la neurotoxina 6-OHDA, produjo una pérdida drástica ($p<0,001$) de cuerpos celulares inmunoreactivos a la enzima TH alrededor del sitio de inyección de la (Fig. 4).

DISCUSIÓN

En el presente estudio, se evaluó el efecto del trasplante intraestriatal de Celulas Madre Mesenquimales humanas (hMSC en inglés) transfectadas con GFP sobre la conducta motriz de ratas con lesión neurotóxica unilateral por

6-OHDA unilateral en la sustancia negra evaluadas por una batería comportamental compuesta por Test neurológico, Pole Test y Barra Transversal. Cabe resaltar que hMSC fueron transfectadas para estimar la posibilidad de diferenciación a distintos linajes celulares del sistema nervioso y a su vez valorar si a través de este mecanismo, se pudiera resarcir el daño causado a lo largo de la vía nigroestrial, sin embargo, dentro de los resultados celulares encontrados, las hMSC-GFP+ se diferenciaron a solo a neuronas (datos no mostrados), y que los resultados que aquí se muestran se refieren al efecto de este trasplante sobre la conducta motora inducida por la inyección intranigral de 6-OHDA. En este sentido, los animales lesionados presentaron una marcada asimetría motora demostrada en la batería de pruebas comportamentales realizadas, sin embargo, hubo una significativa mejoría en los animales que recibieron el trasplante y mediante análisis de inmunofluorescencia de la enzima tirosina hidroxilasa se observó una degeneración de las estructuras involucradas que cuando se analiza

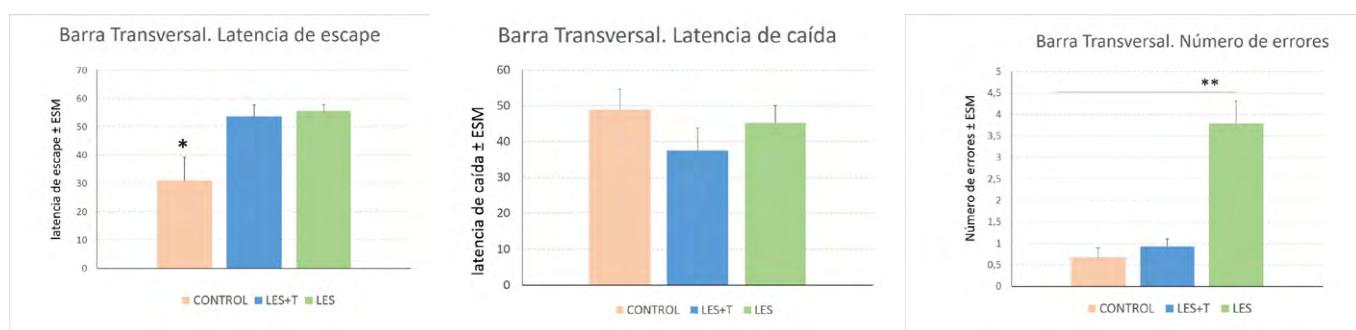


Figura 3. a. Latencia de Escape: Comparación del promedio de la latencia de escape entre los grupos control, lesionado y trasplantado, se respresenta: Latencia de escape (ordenadas), grupos control. LES+T y LES (abcisas). Cada grupo muestra con la desviación estándar. b. Latencia de Caída: Comparación del promedio de la latencia de caída entre los grupos control, lesionado y trasplantado, se representa: Latencia de caida (ordenadas), grupos control. LES+T y LES (abcisas). Cada grupos muestra con la desviación estándar. c. Número de Errores: Comparación del número de errores cometidos en la ejecución de la prueba en los 3 grupos control, lesionado y trasplantado, se respresenta: Número de Errores (ordenadas), grupos control. LES+T y LES (abcisas).

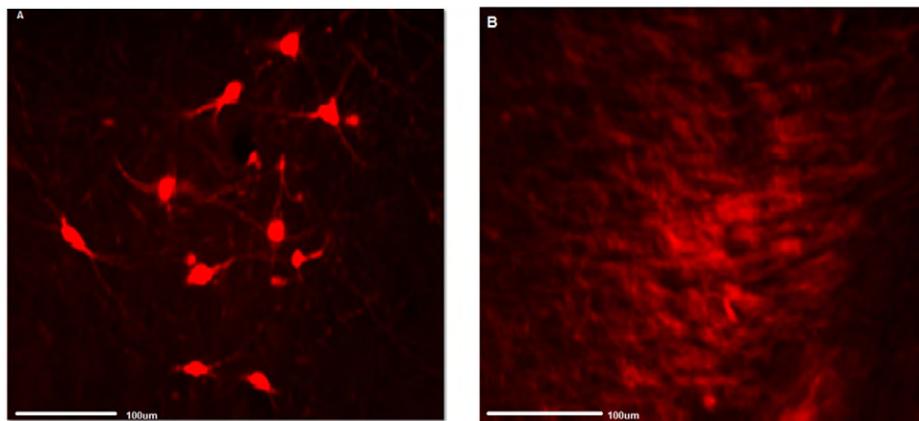


Figura 4. Efecto de la inyección intranigral de 6-OHDA en células inmunoreactivas a Tirosina Hidroxilasa (TH). A. Lado contralateral a la lesión. B. Lado ipsilateral a la lesión.

junto con los resultados comportamentales, está asociada a la disfunción motriz. Las rotaciones inducidas por apomorfina se utilizaron en este trabajo como predictoras de la efectividad de la lesión y el trasplante, puesto el comportamiento rotatorio inducido por apomorfina, es equivalente a la depleción DAérgica de más del 70 % en el lugar de la inyección. (Xion *et al.*, 2010; Piennar *et al.*, 2012). De acuerdo con el método de evaluación usado, la técnica de lesión empleada dió lugar a diferentes grados de pérdida de dopamina estriatal. El 100 % de los animales a los que se les injectó la neurotoxina mostraron una conducta de giro que cumplía con los criterios de inclusión establecidos para este estudio (Fig. 1). La comprobación de lesión completa de la vía negroestriatal a través de las siete vueltas contralaterales al hemisferio lesionado, tras la inyección de apomorfina, está de acuerdo con lo propuesto por Pavón *et al.* (1998) y Blanco *et al.* (2010). Además, esta prueba también demostró que existe una mejoría en los animales experimentales después del trasplante al reducir el número de vueltas por minutos en contraste con los datos que se habían recogido antes de realizar el procedimiento Boronat-García *et al.* (2016) y por Piennar *et al.* (2012). Finalmente, al comprobar histológicamente la lesión, se observó que todos los animales seleccionados para incluirse en los grupos experimentales de trasplante, así como los controles lesionados, mostraron una extensa pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SN (Fig. 4). Aunque el sistema nervioso central puede mitigar, al menos parcialmente, la pérdida neuronal en virtud de su plasticidad, las perturbaciones que sobrepasan ciertos límites tolerables ocasionan deficiencias funcionales irreversibles. Esta pérdida ocasiona una intensa disminución en la concentración de dopamina en las áreas de proyección estriatal (caudado y putamen) y se considera fundamental en la generación del defecto motor. Se observó además, una disminución significativa en la conducta de giro inducida por apomorfina, en animales del grupo LES-T, (Fig. 1), mostrando la eficacia del trasplante. Estos resultados están en línea con los de otros autores que afirman que el trasplante de células madre mesenquimales mejora los trastornos conductuales en los animales lesionados con 6-OHDA (Lescaudron *et al.*, 2003; Pavon *et al.*, 2004), además el trasplante de células madre mesenquimales reducen la gliosis producida por la lesión, posiblemente la inflamación y la neurodegeneración- en parte producida por la misma inflamación- también se ve negativamente influenciada, como lo menciona Hoban *et al.*, 2015. Este hecho puede ser responsable, al menos en parte, de la recuperación motora vista en el grupo experimental después del trasplante. Por otro lado, la acción positiva del trasplante puede estar modulada también por la producción de diferentes factores neurotróficos por las células madre mesenquimales transplantadas, que ejercen su acción sobre las células que están en vía de muerte y/o que circundan los tejidos lesionados (Xion *et al.*, 2010; Levy *et al.*, 2016).

Estos factores potencian la supervivencia de las neuronas, favorecen su diferenciación y funcionamiento e inducen a la formación de sinapsis. En la literatura se han publicado datos referentes a la producción por parte de la células madre mesenquimales de factores neurotróficos, tales como el BDNF (del inglés Brain Derive Neurotrophic Factor) (Levy *et al.*, 2016); por tanto, este podría ser otro mecanismo a través del cual se pueda explicar cómo estas células revierten los efectos de la lesión producida por el 6-OHDA.

Para complementar la evaluación de los estados sensoriomotor de los sujetos pre y post-trasplante, se desarrollaron dos tests más, el primero de ellos es el Pole test, que valora los trastornos del movimiento relacionados con los ganglios basales en ratas y ratones, aquí se observó una diferencia significativa entre los animales hemiparkinsonizados y los animales transplantados en relación con los animales control ($p=0,0442$). Se conoce que la deficiencia dopaminérgica representa un obstáculo para la aplicación efectiva de la fuerza requerida para los movimientos coordinados de todo el cuerpo (Woodle *et al.*, 2008). en donde se incluyen alteraciones en el procesamiento de la información táctil en la etapa temprana de la EP y deterioro propioceptivo además de daño en el control motor fino en EP, todos afectados directamente por la disfunción sensorial (Uylings *et al.*, 2003) y en los modelos de hemiparkinsonismo (Gerstenberger *et al.*, 2016). Los errores en el Pole test (ver Fig. 2 der) representan la calidad de la respuesta motriz evidenciada a través de la integración de los movimientos necesarios para la realización de una actividad cualquiera, desde la posición de la cabeza y la dirección de la mirada, hasta la simetría corporal y utilización de extremidades y de la cola (Matsura *et al.*, 1997), actividad que merece su éxito a la coordinación funcional de los ganglios basales y la corteza motora que participan en la generación de los movimientos cuando se utiliza la retroacción para el control posicional. Los animales que recibieron terapia celular, mejoraron en este parámetro. Al evaluar los errores cometidos por los animales de los diferentes grupos para realizar el pole test, se observó que el grupo control fue el que desarrolló la prueba con mayor éxito ($p =0,004$), ($\bar{X}= 0,86$ SD $\pm 1,21$) pues utilizó apropiadamente todas sus extremidades correctamente, incluyendo la cola como soporte para descender desde la cima del cilindro hasta la base del mismo, los animales hemiparkinsonizados por el contrario fueron los que presentaron mayor cantidad de errores ($\bar{X}= 3,9$ SD $\pm 0,32$) debido a su incapacidad de corregir posición demostrando su asimetría corporal, en contraste, los animales transplantados mostraron una mejoría significativa con respecto al grupo lesionado en la integración de los movimientos necesarios y uso de sus extremidades y cola para la realización de esta actividad, resultados similares a lo reportado por Garrido (2004). La segunda prueba usada fue la barra transversal que permite observar y comparar el compromiso motor en los sujetos experimentales evaluados.

La Latencia de Escape (LE) refleja las posibilidades reales del animal para realizar movimientos compensatorios que le permiten alcanzar una de las dos plataformas. Caso contrario sucede al evaluar la latencia de Caída (LC), que representa un indicador directo del deterioro sensoriomotor de la rata hemiparkinsonizada (Blanco, 2010). En los resultados obtenidos en este trabajo, se evidenció que se evidenció que las ratas hemiparkinsonizadas y las trasplantadas demoran más tiempo en comparación con el grupo control ($p<0,001$). Sin embargo, a pesar de no encontrar diferencias significativas entre los grupos LES y LES+T, existe una pequeña diferencia en los tiempos obtenidos en ambos grupos, que se traduciría en una leve mejora en los animales del grupo LES+T frente a los del grupo LES, suponiendo de esta manera que evaluaciones del trasplante al 2do, 3er y hasta 4to mes, podrían arrojar diferencias más notables. Algunos autores han señalado que la deficiencia dopaminérgica resulta en un incremento de la demora tanto para iniciar el movimiento como para cruzar la barra y alcanzar la plataforma, consistente con la acinesia y bradicinesia observada en modelos animales de EP (Allbutt y Henderson, 2007; Blanco, 2010). La disminución de la LC obtenida en los animales trasplantados en relación con los hemiparkinsonizados apunta a un mayor compromiso sensoriomotor en la planificación y ejecución de la tarea motora. Por otra parte la cuantificación de los errores cometidos por los animales ofrece una visión más amplia del desarrollo de la prueba. En esta prueba, los animales del grupo CON mostraron un patrón de locomoción con secuencias alternantes de acoplamiento diagonal, típico de animales cuadrúpedos (Blanco, 2010), las ratas hemiparkinsonizadas por el contrario mostraron incapacidad para usar las extremidades contralaterales a la lesión tanto para realizar ajustes posturales como movimientos de locomoción (Woodle y Schallert, 2004) (ver Fig.2). La literatura muestra que las implicaciones motoras producidas como consecuencias de la inyección de ésta neurotoxina en Medial ForeBrain (MFB) (Sindhu *et al.*, 2005), Estriado (Blum *et al.*, 2001) y SNpc (Nezhadi *et al.*, 2016), producen pérdidas significativas de habilidades motoras entre grupos control y grupos lesionados, como se manifestó anteriormente. La lesión en SNpc que fue realizada en este trabajo, interrumpe la comunicación DAérgica de este núcleo hacia GB (Caudado- Putamen), que a su vez, está involucrado en el desarrollo de la actividad motriz y recibe a su vez proyecciones de áreas motoras y sensoriomotoras del neo córtex. En este sentido, lesiones provocadas en esta región, muestran efectos pronunciados en la iniciación del movimiento y comportamiento motor (Pieruccini-Faria *et al.*, 2016). Estas dos pruebas sensoriomotoras son apropiadas, ya que no requiere extensas sesiones de entrenamiento ni privación de alimentos como componente motivacional. También se demostró que después del trasplante los animales mejoran en el empleo del uso de sus extremidades,

por lo que con esta prueba se evidencia también el efecto positivo del trasplante (ver Fig. 2). De manera general, los resultados obtenidos están en concordancia con lo reportado por otros autores que ya han utilizado pruebas para medir el déficit motor producido por la lesión y la recuperación de este tras un trasplante de células madre (Pavón, 2004). Los mecanismos por medio de los cuales aparece la mejora comportamental en estos animales, están muy relacionados con los explicados en la prueba de la conducta de Giro inducida por apomorfina. Desde el punto de vista histológico la inyección unilateral de la 6-OHDA, genera una lesión en la que se denota muerte sustancial de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra que está en relación con lo reportado por otras investigaciones (Debeir *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2005; Scholtissen *et al.*, 2006; Bagga *et al.*, 2015; Boronat-García *et al.*, 2016). Estos resultados, finalmente esclarecen la capacidad de adaptación de las células madre mesenquimales. En general, las MSC humanas y de rata pueden proliferar de manera estable *in vitro*, mientras que los de los monos y ratones son vulnerables a la manipulación (Sloan *et al.*, 1990) y a las técnicas de trasplante empleadas. En este trabajo, el grupo experimental con trasplante celular mostró una disminución sustancial en el comportamiento de rotación inducido por apomorfina contrario a lo que mencionan Piennar *et al.* (2012), y en las pruebas de comportamiento no farmacológicas, tales como el pole test y la barra transversal. Los resultados obtenidos en este bioensayo, mostraron que los test propuestos permiten hacer una valoración más sensible que resuelve en parte el entendimiento de los problemas de integración, conectividad y migración de estas células mostrados a través de la ejecución de tareas sensoriomotoras. Cabe resaltar que se hace necesaria la valoración comportamental no solo al mes después del trasplante sino que también, dos, tres y hasta cuatro meses después, donde se pueda evaluar la capacidad del trasplante para regenerar vías sinápticas deterioradas en ésta y otras enfermedades.

CONCLUSIONES

Por medio de este estudio se demostró que el trasplante de células madre mesenquimales GFP+ puede disminuir el daño funcional y asimetría motora, característica del modelo experimental en ratas hemiparkinsonizadas. Los resultados comportamentales mostraron en todas sus pruebas que hubo una mejoría significativa en la habilidad para realizar actividad motora de los animales trasplantados con respecto a los hemiparkinsonizados, esto apunta a un mayor compromiso sensoriomotor en la ejecución de las pruebas que el grupo experimental obtuvo gracias al trasplante. Adicionalmente es posible que el lado “no lesionado”, contralateral a la inyección de 6-OHDA, sea insuficiente para compensar la deficiencia motora cuando la lesión es de gran extensión.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el apoyo de la Oficina Central de Investigaciones de la Universidad del Tolima.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCIAS

- Alheid G. F., Heimer L., Switzer R.S. Basal Ganglia. In: Paxinos G, editor. *The Human Nervous System*. Academic Press: San Diego; 1990. p. 483-582.
- Allbutt N. H., Henderson J. M. Use of the narrow beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J Neurosci methods*. 2007;159(2):195-202. Doi:10.1016/j.jneumeth.2006.07.006
- Aarsland D., Kurz M. W. The epidemiology of dementia associated with Parkinson disease. *J Neurol Sci*. 2010;289(1-2):18-22. Doi:10.1016/j.jns.2009.08.034
- Aarsland D. Cognitive impairment in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Parkinson Rel Disor*. 2015;22(1):144-148. Doi:10.1016/j.parkreldis.2015.09.034
- Bagga V., Dunnet S. B., Fricker R. A. The 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease-Terminal striatal lesions provide a superior measure of neuronal loss and replacement than median forebrain bundle lesions. *Behav Brain Res*. 2015;288:107-117. Doi:10.1016/j.bbr.2015.03.058.
- Bazán E., Herranz A. S., Reimers D., Alonso R., Díaz J. J., Lobo M., et al. LGF («liver growth factor») como factor de proliferación, migración y diferenciación de las células madre neurales y su posible utilidad en enfermedad de Parkinson. *Mapfre Medicina*. 2015;16(4):237-247.
- Benitez G. Medicina regenerativa y terapia celular. *Rev Mex Med Trans*. 2011;4(2):70-77.
- Blanco Lezcano L., Lourdes Del C. L., Lic. Fernández C., Serrano Sánchez T., Pavón Fuentes N; Francis Turner, L. Aplicación del test de la barra transversal modificado para evaluar ratas hemiparkinsonizadas. *Acta biol. Colomb.* 2010;15(2):189-202.
- Blum D., Torch S., Lambeng N., Nissou M., Benabid AL, Sadoul R., Verna JM. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*. 2001;65:135-172. Doi:10.1016/S0301-0082(01)00003-X
- Boronat-García A., Palomero-Rivero M., Guerra-Crespo M., Millán Aldaco D., Drucker-Dolin R. Intraestriatal Grafting of chromospheres: Survival and Functional Effects in the 6-OHDA Rat Model of Parkinson's Disease. *PLoS ONE*. 2016;11(8):e0160854. Doi:10.1371/journal.pone.0160854
- Bové J., Prou D., Perier C., Przedborski S. Toxin induced models of Parkinson's disease. *NueroRX*. 2005;2:484-494. Doi:<http://dx.doi.org/10.1602/neurorx.2.3.484>
- Bouchez G., Sensebé L., Vourc'h P., Garreau L., Bodard S., Rico A., et al. Partial recovery of dopaminergic mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson's disease. *Neurochem inter*. 2008;52(7):1332-1342. Doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2008.02.003>
- Bredel A., Correia A., Anisimov S., Elmi M., Paul G., Roybon L., et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cells to a rat model of parkinson's disease: effect of *in vitro* differentiation on graft survival and teratoma formation. *Stem Cells*. 2006;24:1433-1440. Doi:10.1634/stemcells.2005-0393
- Bures J., Buresova O., Huston J. P. Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V. 1983.
- Crabtree D., Zhang J. Genetically engineered mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res Bull*. 2012;88(1):13-32. Doi:10.1016/j.brainresbull.2011.07.019
- Da Cunha C., Prediger R. D. S., Miyoshi E., Takahashi R. A rat model of the cognitive impairments in Parkinson's disease. *Rev Mex Anal Cond*. 2006;32(2):219-240.
- Debeir T., Ginestet L., Francois C., Laurens S., Martel J.C., Chopin P., Marien, et al. Effect of intraestriatal 6-OHDA lesion on dopaminergic innervations of the rat cortex and globus pallidus. *Experimental Neurology*. 2005;193:444-454. Doi:10.1016/j.expneurol.2005.01.007
- Deierborg T., Denis S., Laurent R., Vanessa H., Patrik B., Emerging restorative treatments for Parkinson's disease. *Progress Neurobiol*. 2008;85(4):407-32. Doi:10.1016/j.pneurobio.2008.05.001
- Gerstenberger J., Bauer A., Helmschrodt C., Richter A., Richter F. The novel adaptive rotating beam test unmasks sensorimotor impairments in a transgenic mouse model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Res*. 2016;102-110. Doi:10.1016/j.bbr.2016.02.017
- Glavaski-Joksimovic A., Bohn, M. C. Mesenchymal stem cells and neuroregeneration in Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2013;247:25-28. Doi:10.1016/j.expneurol.2013.03.016.
- Issy A. C., Padovan-Neto F., Lazzarini M., Bortolanza M., Del-Bel E. Disturbance of sensorimotor filtering in the 6-OHDA rodent model of Parkinson's disease. *Life Sciences*. 2015;125:71-78. Doi:10.1016/j.lfs.2015.01.022
- Lescaudron L., Unni D., Dunbar G. L. Autologous adult bone marrow stem cell transplantation in an animal model of Huntington's Disease: Behavioral and morphological outcomes. *International J Neuroscience*. 2003;113:945-956. Doi:10.1080/00207450390207759
- Levy M., Boulis N., Rao M., Svendsen C. N. Regenerative cellular therapies for neurologic diseases. *Brain Res*. 2016;1638(A):88-96. Doi:10.1016/j.brainres.2015.06.053
- Maranis S., Tsouli S., Konitsiotis S. Treatment of motor symptoms in advanced Parkinson's disease: A practical

- approach. *Progress Neuro-Psychopharmacol Biol Psychol*. 2011;35:1795-1807. Doi:10.1016/j.pnpbp.2011.05.014
- Martín I., De Bouer J., Sensebe L. A relativity concept in mesenchymal stromal cell manufacturing. *Cyotherapy*. 2016;18:613-620. Doi:10.1016/j.jcyt.2016.02.004
- Masaaki K., Dezawa M. Parkinson's Disease and Mesenchymal Stem Cells: Potential for Cell-Based Therapy. Hindawi Publishing Corporation *Parkinson's Disease Volume* 2012;9 Doi:10.1155/873706.
- Matsura K., Kabuto H., Makino H., Ogawa N. Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion. *Journal of Neuroscience Methods*. 1997;73(1):45-48. Doi:10.1016/S0165-0270(96)02211-X
- Mendez J. S., Finn B. W. Use of 6-hydroxydopamine to create lesions in catecholamine neurons in rats. *J Neurosurgery*. 1975;42:166-173.
- Nezhadi A., Sheibani V., Esmaeilpor K., Shabani M., Mahani S. Neurosteroid allopregnanolone attenuates cognitive dysfunctions in 6-OHDA-induced rat model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*. 2016;305:258-264. Doi:10.1016/j.bbr.2016.03.019
- Pavón N., Vidal L., Álvarez P., Blanco L., Torres A., Rodríguez A. Evaluación conductual del modelo de lesión unilateral en ratas con 6-hidroxidopamina. Correlación entre las rotaciones inducidas por d-anfetamina, apomorfina y la prueba de habilidades manuales. *Revista Neurología*. 1998;26:915-918.
- Pavón Fuentes F., Blanco Lezcano L., Martínez Martín L., Castillo-Díaz L., De La Cuétara Bernal K., García Miniet, et al. Trasplante de células estromales en el modelo de lesión por 6-OHDA. *Revista de Neurología*. 2004;39(4):326-334.
- Paxinos G., Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th Edition. Elsevier Academic Press pag. 206
- Peter, H., Seviour, P., Iversen S. (1975). Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. *Brain Research*. 2005;94 3,5: 507-522.
- Pienaar I., Lu B., Scharlert T. Closing the gap between clinic and cage: Sensori-motor and cognitive behavioural testing regimens in neurotoxin-induced animal models of Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev*. 2012;36(10):2305-2324. Doi: 10.1016/j.neubiorev.2012.07.009
- Pieruccini-Faria F., Jones J.A., Almeida Q. J. Insight into dopamine-dependent planning deficits in Parkinson's disease: A sharing of cognitive & Sensory Resources. *Neurosci*. 2016;318: 219-229. Doi:10.1016/j.neuroscience.2016.01.019
- Poletti M., Enrici I., Bonuccelli U., Adenzato M. Theory of Mind in Parkinson's disease. *Behav Brain Res*.
- 2011;219:342-350. Doi:10.1016/j.bbr.2011.01.010
- Sindhu K., Saravanan K., Mohanakumar K. Behavioural differences in a rotenone-induced hemiparkinsonian rat model developed following intranigral or median forebrain bundle infusion. *Brain Res*. 2005;1051(1-2):25-34. Doi: 10.1016/j.brainres.2005.05.051
- Sloan D. J., Baker B., Puklavec M., Charlton H. The effects of site of transplantation and histocompatibility differences on the survival of neural tissue transplanted to the CNS of defined inbred rat strains. *Prog Brain Res*. 1990; 82:141-52.
- Taylor T. N., Greene J. G., Miller G. W. Behavioural phenotyping of mouse models of Parkinson's Disease. *Behav Brain Res*. 2010;211(1):1-10. Doi:10.1016/j.bbr.2010.03.004
- Tronci E., Shin E., Björklund A. Amphetamine-induced rotation and L-DOPA induced dyskinesia in the rat 6-OHDA model: a correlation study. *Neurosci Res*. 2012;73(2):168-172. Doi:10.1016/j.neures.2012.03.004
- Uylings H., Groenewegen H. J., Kolb B. Do rats have a prefrontal cortex?. *Behav Brain Res*. 2003;146(1-2):3-17. Doi:10.1016/j.bbr.2003.09.028
- Venkataramana N. K., Kumar S. K., Balaraju S., Radhakrishnan R. C., Bansal A., Dixit A., et al. Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Transl Res*. 2010;155: 62-70. Doi:10.1016/j.trsl.2009.07.006
- Wang H., Wang Y., Cui S., Zhang T. Cognitive impairment in Parkinson's disease revealed by event-related potential N270. *J Neurol Sci*. 2002;194(1):49-53. Doi:10.1016/S0022-510X(01)00674-8
- Warraich S., Allbutt H., Billing R., Radford J., Coster M., Kassiou M., et al. Evaluation of behavioural effects of a selective NMDA NR1A/2B receptor antagonist in the unilateral 6-OHDA lesion rat model. *Brain Res Bull*. 2009;78:85-90. Doi: 10.1016/j.brainresbull.2008.08.023
- Woodle M., Kane J., Chang J., Cormack L., Schallert T. Enhanced function in the good forelimb of hemi-parkinsonian rats: compensatory adaptation for contralateral postural instability?. *Exp Neurol*. 2008;211:511-517. Doi:10.1016/j.expneurol.2008.02.024
- Woodle M., Schallert T. The interplay between behaviour and neurodegeneration in rat models of Parkinson's disease and stroke. *Rest Neurol Neurosc*. 2004;22:153-161.
- Xiong N., Cao X., Zhang Z., Huang J., Chen C., Zhang Z., Jia M., et al. Long-Term efficacy and safety of human umbilical cord mesenchymal stromal cells in rotenone-induced hemiparkinsonian rats. *Biol Blood Marrow Transpl*: J ASBMT. 2010;16(11):1519-1529. Doi:10.1016/j.bbmt.2010.06.004